

Título: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS HUMANIZADOS DE SÍNDROME DE NETHERTON PARA LA EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE NUEVOS ABORDAJES TERAPÉUTICOS

Nombre: Gálvez Cortés, Victoria

Universidad: Universidad Complutense de Madrid

Departamento: Universidad Complutense de Madrid

Fecha de lectura: 29/10/2019

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad Complutense de Madrid

Dirección:

> **Director:** MARTA CARRETERO TRILLO

> **Director:** FERNANDO LARCHER LAGUZZI

Tribunal:

> **presidente:** ELENA MARIA VARA AMEIGEIRAS

> **secretario:** EVA JIMENEZ PEREZ

> **vocal:** MIGUEL QUINTANILLA AVILA

> **vocal:** MARÍA ÁNGELES JUARRANZ DE LA FUENTE

> **vocal:** M. ANGELA HERNANDEZ MARTIN

Descriptor:

> HISTOLOGIA HUMANA

> DERMATOLOGIA

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Resumen: El Síndrome de Netherton (SN) es un trastorno autosómico recesivo que presenta una prevalencia aproximada de 1 por cada 200.000 nacimientos. Los recién nacidos que padecen SN exhiben eritrodermia ictiosiforme congénita generalizada, un defecto estructural del pelo denominado trichorrhexis invaginata o pelo de bambú y manifestaciones atópicas de piel. Aunque el SN tiene una tasa de mortalidad del 20% durante el primer año de vida, los síntomas pueden mejorar con la edad y generalmente los pacientes acaban desarrollando una condición más leve denominada ictiosis lineal circunfleja. El SN es causado por mutaciones en el gen SPINK5 (Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5) que codifica para LEKTI (Lympho-Epithelial Kazal-Type-related Inhibitor), un inhibidor de serina proteasas expresado en la epidermis y otros epitelios estratificados. Se ha descrito que LEKTI inhibe varias proteasas que incluyen miembros de la familia de peptidasas relacionadas con la calicreína (KLKs), principalmente KLK5, KLK7 y KLK14. A su vez, la actividad desregulada de KLK5, y posiblemente también de KLK7, se considera una causa importante en la patología de SN. En la epidermis de los pacientes de SN, KLK5 inicia una cascada proteolítica por activación de KLK7 y KLK14 que conduce a la degradación de las proteínas corneodesmosomales desmogleína-1 (DSG1), desmocolina-1 (DSC1) y corneodesmosina (CDSN), provocando un desprendimiento prematuro del estrato

córneo (SC) que contribuye de forma adicional a agravar los defectos de la barrera cutánea. KLK5 y KLK14 también son responsables de estimular señales proinflamatorias y proalérgicas a través de la activación de PAR2 (Proteinase-Activated Receptor 2), y KLK5 y KLK7 participan en la maduración de péptidos antimicrobianos de la familia de las catelicidinas. Por lo tanto, LEKTI coordina varios eventos proteolíticos importantes en la fisiología epidérmica y su ausencia provoca la desregulación de múltiples vías en el SN. El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el desarrollo y caracterización de diferentes modelos para el SN, tanto organotípicos in vitro como modelos humanizados en piel in vivo, con el objeto de profundizar en el conocimiento de las bases patológicas de la enfermedad. Además, estos modelos constituyeron una herramienta de gran valor para el desarrollo y validación de distintas aproximaciones terapéuticas para la reversión del fenotipo cutáneo. Para el desarrollo de los modelos humanizados se obtuvieron queratinocitos y fibroblastos a partir de una pequeña biopsia de piel, que fueron ensamblados tras su expansión en un equivalente cutáneo mediante bioingeniería de tejidos, y posteriormente trasplantados a ratones inmunodeficientes. Uno de los modelos se generó a partir de una biopsia de piel de paciente de SN, y el otro a partir de una biopsia procedente de donante sano, donde los queratinocitos fueron modificados mediante técnicas de edición génica utilizando el sistema de nucleasas CRISPR/Cas9 para la eliminación funcional de SPNK5. A partir de las mismas células, queratinocitos y fibroblastos, se desarrollaron modelos equivalentes de cultivos organotípicos in vitro. La caracterización de los diferentes modelos generados determinó que, en conjunto, reproducen las principales características histopatológicas de la enfermedad y corroboran las bases moleculares implicadas en las manifestaciones clínicas presentes en esta genodermatosis. Además, se testó una estrategia terapéutica para la recuperación de expresión de SPINK5 mediante terapia génica, la cual demostró que al restaurarse la expresión de la proteína LEKTI en epidermis se recupera el fenotipo normal de la piel. Estos nuevos modelos experimentales sirvieron también para validar la eficacia de otra aproximación terapéutica basada en la aplicación tópica del inhibidor de proteasas SFTI-I10H (Sunflower Trypsin Inhibitor).